

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号:

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

骨髓间充质干细胞来源的 periostin 蛋白
促进乳腺癌细胞的肺转移

Bone marrow mesenchymal stem cell-derived periostin
promotes lung metastasis of breast cancer cells

俞东红

指导教师姓名: 欧阳高亮 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015 年 04 月

论文答辩时间: 2015 年 05 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 05 月

骨髓间充质干细胞来源的 periostin 蛋白促进乳腺癌细胞的肺转移

俞东红

指导教师: 欧阳高亮 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

英文缩写对照表	V
摘 要.....	VII
Abstract.....	VIII
1 前言.....	9
1.1 间充质干细胞	9
1.1.1 间充质干细胞概述	9
1.1.2 间充质干细胞的应用	2
1.2 间充质干细胞与肿瘤发生发展	3
1.2.1 间充质干细胞与肿瘤微环境	3
1.2.2 间充质干细胞与基质蛋白	5
1.3 Periostin 与肿瘤	6
1.3.1 基质蛋白 periostin	6
1.3.2 Periostin 与肿瘤发生发展	7
1.4 本课题研究的目标内容和意义	8
2 材料与方法	9
2.1 实验材料	9
2.1.1 实验药品与试剂	9
2.1.2 实验动物	10
2.1.3 细胞株和质粒	10
2.1.4 实验仪器	10
2.2 实验方法	11
2.2.1 分离、培养和鉴定小鼠骨髓间充质干细胞	11
2.2.2 小鼠脂肪间充质干细胞分离的培养	13
2.2.3 细胞共培养实验	14
2.2.4 细胞迁移实验	14
2.2.5 细胞稳定转染	14
2.2.6 蛋白印记实验	15
2.2.7 细胞免疫荧光	16

2.2.8 荧光定量 PCR	17
2.2.9 小鼠乳腺移植瘤模型	19
2.2.10 动物组织包埋和切片	19
2.2.11 H&E 染色.....	20
3 结果与分析	22
3.1 小鼠骨髓间充质干细胞体外分离培养和鉴定	22
3.2 Periostin 蛋白在小鼠骨髓间充质干细胞中高表达	24
3.3 骨髓间充质干细胞以 CAFs 形式作用于 4T1-GFP.....	25
3.4 骨髓间充质干细胞来源的 periostin 蛋白促进 4T1 的肺转移	26
3.5 骨髓间充质干细胞来源的 periostin 蛋白与 4T1 直接接触促进转移	27
3.6 骨髓间充质干细胞来源的 periostin 蛋白可能调控 4T1 中 CXCL2、VEGFA、 iNOS mRNAs 水平.....	30
4 讨论.....	33
5 结论.....	36
参考文献:	37
致谢.....	45

Table of Contents	
Abbreviation	V
Abstract(Chinese)	VII
Abstract(English)	VIII
1Forewards	9
1.1Mesenchymal stem cells.....	9
1.1.1Overview of mesenchymal stem cells	9
1.1.2The application of mesenchymal stem cells	2
1.2 Mesenchymal stem cells and tumor progression.....	3
1.2.1 Mesenchymal stem cells and tumor microenvironment.....	3
1.2.2 Mesenchymal stem cells and Matricellular proteins	5
1.3 Periostin	6
1.3.1 Matricellular protein periostin	6
1.3.2 Periostin and tumor progresstion.....	7
1.4 Contents and significance of this project	8
2 Materials and methods	9
2.1 Materials	9
2.1.1 Drugs and Reagents	9
2.1.2 Animals.....	10
2.1.3 Cell lines and plasmids.....	10
2.1.4 Instruments	10
2.2 Methods.....	11
2.2.1 Isolate、 culture and identify mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells.....	11
2.2.2 Isolate and culture mouse adipose derived mesenchymal stem cells	13
2.2.3 Cell co-culture assay.....	14
2.2.4 Cell migration assay	14
2.2.5 Stably transfected cell lines	14

2.2.6 Western blotting	15
2.2.7 Immunofluorescence of cells	16
2.2.8 Quantitative real-time PCR	17
2.2.9 Model of mammary gland transplantable tumor	19
2.2.12 Animal tissue embedding and sectioning	19
2.2.13 H&E dyeing	20
2.2.14 Plasmid transformation and extraction	20
3 Results and analysis	22
3.1 Isolate, culture and identify mouse BM-MSCs in vitro	22
3.2 Periostin was highly expressed in mouse BM-MSCs	24
3.3 BM-MSCs acting on 4T1-GFP in the form of CAFs	25
3.4 BM-MSCs secreted periostin to promote 4T1 lung metastasis	26
3.5 BM-MSCs derived periostin could enhance metastasis in close proximity to 4T1	27
3.6 BM-MSCs derived periostin may regulate CXCL2, VEGFA, iNOS mRNA in 4T1	30
4 Discussions	33
5 Conclusions	36
Reference:	37
Acknowledgements	45

英文缩写对照表

Abbreviations	The full name
α -SMA	α -Smooth muscle actin
ADSCs	Adipose-derived mesenchymal stem cells
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
bFGF	basic fibroblast growth factor
BM-HSCs	Bone marrow-residing hematopoietic stem cells
BM-MSCs	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells
CAFs	Cancer-associated fibroblasts
CCL2	CC chemokine ligand 2
CCL5	CC chemokine ligand 5
CXCL1/2	CXCchemokine ligand 1/2
CXCR5	CXC chemokine receptor 5
CCN1	CCN family member 1
CFU-Fs	Colony forming units-fibroblasts
ECM	Extracellular matrix
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EPCs	Endothelial progenitor cells
ESCs	Embryonic stem cells
FAK	Focal adhesion kinase
FSP-1	Fibroblast specific protein-1
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating
HSCs	Hematopoietic stem cells
IFN- γ	Interferon- γ
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible NOS
LOX	Lysy loxidase
MEFs	Mouse embryonic fibroblasts
MMPs	Metalloproteinases
MPs	Matricellular proteins
MS	Multiple sclerosis

MSA	Multiple system atrophy
MSCs	Mesenchymal stem cells
OPN	Osteopontin
OSF-2	Osteoblast-specific factor 2
POSTN	Periostin
SLE	Systemic lupus erythematosus
SPARC	Secreted protein,acidic,cysteine-rich
TAFs	Tumor-associated fibroblasts
TAMs	Tumor-associated macrophages
TECs	Tumor-associated endothelial cells
TNC	Tenascin-C
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A

摘 要

间充质干细胞是骨髓基质中维持造血稳态最重要的细胞之一，在肿瘤发生发展过程能被募集到肿瘤微环境中，通过多种机制与肿瘤细胞或者其他基质细胞相互作用。Periostin 作为一种非结构性的细胞外基质蛋白，在许多恶性肿瘤中都有高表达，与肿瘤生长和转移密切相关。间充质干细胞能够分泌大量的 periostin 蛋白，但它在肿瘤生长和转移中所起的作用并不清楚。本研究发现骨髓间充质干细胞来源的 periostin 蛋白能够促进乳腺癌向肺部发生转移，但对于乳腺癌原位瘤生长没有明显作用。骨髓间充质干细胞和乳腺癌细胞在体外直接共培养后，骨髓间充质干细胞能以肿瘤相关成纤维细胞的形式，增强乳腺癌细胞 CXCL2、VEGFA、iNOS 的 mRNA 水平。本研究还发现骨髓间充质干细胞促进乳腺癌细胞转移必须基于近距离的直接接触作用，若两者细胞分离则促进作用减弱甚至消失。因此，本研究的结果表明，在肿瘤微环境中，骨髓间充质干细胞与肿瘤细胞近距离接触时，能够分泌 periostin 蛋白促进乳腺癌细胞 CXCL2、VEGFA、iNOS mRNAs 的表达水平，从而促进乳腺癌向肺部转移。

关键词：骨髓间充质干细胞；Periostin；乳腺癌；肿瘤转移

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are one of the most vital components to support hematopoiesis in bone marrow stroma. MSCs can be recruited to tumor microenvironment and interact with cancer cells or other stromal cells. Periostin, a non-structural extracellular matrix protein, is dysregulated in various malignant cancers and promotes tumor metastasis. Periostin is overexpressed in MSCs, but the exact role of MSC-derived periostin in tumor growth and metastasis has not been documented. Here we demonstrated that bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) promote breast cancer metastasis to lung, but they have no significant effect on primary tumor. After direct coculture of BM-MSCs and breast cancer cells in vitro, BM-MSCs upregulate the CXCL2, VEGFA and iNOS mRNA levels of breast cancer cells in the form of cancer-associated fibroblasts. Moreover, our research showed that the function of BM-MSCs on breast cancer cells is based on direct contact, and the effect will be decreased even disappeared when they are separated. Thus, our study indicated that BM-MSCs may be recruited closely and secrete periostin in the tumor microenvironment by upregulating CXCL2, VEGFA and iNOS mRNA levels of breast cancer cells to promote their lung metastasis.

Key words: BM-MSCs; Periostin; Breast cancer; Tumor metastasis

1 前言

1.1 间充质干细胞

1.1.1 间充质干细胞概述

干细胞具有两个显著性特征：其一是具有多潜能分化能力，能够分化为许多类型的成熟细胞；其二是能够自我更新，维持组织稳态和生长^[1]。从发现骨髓造血干细胞（Bone marrow-residing hematopoietic stem cells, BM-HSCs）能够在体外成功分离和培养、自我更新并分化为血细胞前体细胞，最终产生血细胞成分以来，干细胞领域的研究得到迅速发展。1974 年 Friedenstein 及其团队发现将小鼠骨髓基质细胞进行异种移植后能够生成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞和网状细胞，这表明骨髓中存在非造血系来源的多潜能始祖细胞，它具有形成骨骼和脂肪的能力^[2, 3]。后来深入研究发现这种始祖细胞在形态上类似成纤维细胞，在体外培养时能够粘附塑料表面生长和扩增，形成成纤维细胞集落形成单位（Colony forming units-fibroblasts, CFU-Fs）^[4]，而且能够分化为成骨细胞、骨骼细胞、软骨细胞、肌腱细胞、心肌细胞、脂肪细胞以及神经细胞等^[5, 6]。基于这些自我更新和多潜能分化性质，这种始祖细胞被称为间充质干细胞（Mesenchymal stem cells, MSCs）。MSCs 来源十分广泛，除了骨髓，还有脂肪、胚胎、皮肤、脐带血、滑膜、羊水等都可以获得^[7]。狭义上的 MSCs 主要指来源于骨髓的间充质干细胞，即骨髓间充质干细胞（Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs）^[8]。不同组织来源的 MSCs 具有不同的分子标记，因此很难找到一个统一的定义方法。目前有三个标准用于鉴定 MSCs：（1）在体外培养时能够贴壁并呈涡旋状生长；（2）表达特异性表面标记 CD105、CD90、CD73，但不表达 CD45、CD14、CD19、CD11b、CD79 α 和 HLA-DR 等标记；（3）能够在体外分化称为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞^[9]。

众所周知，骨髓是脊椎动物造血作用和骨生成的重要部位。造血作用是一个 BM-HSCs 不断增殖、分化、自我更新，并且产生成熟血细胞最后释放到循

环系统中的过程。因此在骨髓微环境中，必然存在许多基质细胞（Stromal cells）来调节 HSCs（Haematopoietic stem cells, HSCs）的静止、增殖和分化等状态，以维持造血稳态^[10]。目前已知有四种主要类型的骨髓基质细胞能够支持造血作用：其一是造血系来源的巨噬细胞，其他三者都是来源于 BM-MSCs，例如网状细胞，脂肪细胞以及成骨细胞^[11]。虽然在骨髓中 BM-MSCs 所占的比例只有 0.0001%-0.01%^[12]，但它却能够通过许多机制来调节造血干细胞，例如细胞间直接接触作用或分泌趋化因子、生长因子、细胞外基质分子等间接作用。正常情况下的造血细胞处于静止状态，当受到一定刺激后，BM-MSCs 能够分化成各种细胞（外周细胞、成骨细胞、骨细胞、内皮细胞），并将它们释放到窦状血管中，组成造血干细胞微环境，支持造血作用^[13, 14]。此外，还有研究表明 MSCs 也能产生一系列白介素（如 IL-1、IL-7、IL-8、IL-11、IL-14、IL-15 等），而且在体外培养存在 IL-1 α 的情况下，能够分泌许多因子，例如 GM-CSF 和 G-CSF 等作用于成熟造血始祖细胞^[15]。因此，在骨髓微环境中，间充质干细胞发挥着维持造血稳态的重要作用。

1.1.2 间充质干细胞的应用

干细胞是一种能够长期自我更新，并且不改变自身性质的细胞。它们在特定生理或者实验条件下可分化为各种特异性的细胞。细胞治疗是基于干细胞的特性结合基因治疗，将干细胞植入组织中，属于再生医学的一个分支。造血干细胞已广泛应用于同种异体的治疗。胚胎干细胞（Embryonic stem cells, ESCs）是从早期胚胎的内细胞团分离出来，在再生医学中也被称为最有潜力的细胞。然而造血干细胞和胚胎干细胞涉及形成畸胎瘤的风险以及道德牵制等问题，使其临床应用受限^[16]。但是 MSCs 则不存在这两方面问题，而且由于其具备自我更新、多潜能分化等干细胞生物学性质，以及来源广泛、易于分离培养和纯化、免疫原性弱、安全性较好等优点，逐渐成为应用于干细胞治疗的理想靶细胞。

基于组织来源广泛以及多潜能分化特点，间充质干细胞在损伤修复中发挥关键性作用，目前许多临床数据也证实这一点。在消化系统方面，自体移植的骨髓间充质干细胞能够有效改善肝硬化患者和乙型肝炎患者的肝功能^[17, 18]。在肌肉骨骼系统方面，骨髓间充质干细胞可以促进牙周组织缺陷、糖尿病下肢缺

血、骨坏死以及皮肤烧伤等的治疗^[19,20]。在控制急性心肌梗塞方面,间充质干细胞也可能发挥有一定作用。Hare 等^[21]通过一项随机双盲法系统性实验对 53 位急性心肌梗塞患者接受 MSCs 长达 6 个月治疗后发现,患者心室心率不齐情况有所减少 ($P=0.025$),而且肺功能有所改善 ($P=0.003$)。

除了在损伤修复上的作用,根据间充质干细胞具有调节免疫反应的能力,目前间充质干细胞在免疫失调治疗上也发挥作用。例如,对于治疗系统性红斑狼疮 (Systemic lupus erythematosus, SLE) 和克罗恩病 (Crohn's disease) 患者,不论是自体移植还是异体移植的 MSCs,都能够有效调控调节性 T 细胞 (Tregs) 发挥作用,从而抑制炎症、减少肾和肠的损伤^[22]。另外也有研究表明,根据 MSCs 的免疫调节作用可将其应用于治疗神经系统疾病,例如多系统萎缩 (Multiple system atrophy, MSA)^[23]、多发性硬化症 (Multiple sclerosis, MS)、肌萎缩侧索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)^[24-26]、中风等^[16]。因此,间充质干细胞是未来治疗损伤修复和免疫失调等疾病的理想靶细胞。

1.2 间充质干细胞与肿瘤发生发展

1.2.1 间充质干细胞与肿瘤微环境

肿瘤转移不仅与肿瘤细胞自身特性有关,而且与肿瘤微环境 (Tumor microenvironment) 密切相关。在肿瘤微环境中存在一系列基质细胞,主要来源于骨髓,特别是髓系细胞,包括 MSCs、肿瘤内皮细胞、巨噬细胞、大量免疫细胞、肿瘤相关成纤维细胞等,它们被招募到肿瘤细胞周围共同构成肿瘤微环境。不仅基质细胞彼此之间可以相互作用,也可通过旁分泌与肿瘤细胞相互作用,从而促进肿瘤细胞生长、侵袭和扩散^[27-29]。肿瘤细胞在原位癌部位能够利用特殊的组织环境,然而当它们离开这个环境,就必须获得在新环境中存活下来的能力。为了达到转移目的,侵入血管的肿瘤细胞必须在血液循环中存活下来,到达远端靶器官,出血管进入实质组织,最后持续生长。而这个过程是低效率并且受到肿瘤微环境的影响。例如,在进入转移位置时癌细胞凋亡或者衰老能够阻止大部分癌细胞的扩散;癌细胞只能定向转移到几个特定的组织部位^[30]。因此,肿瘤微环境是肿瘤生长和转移的关键影响因素。

间充质干细胞作为肿瘤微环境中的一种基质细胞，在影响肿瘤生长和转移中发挥重要作用。在肿瘤发生发展中，它能够分化为肿瘤相关成纤维细胞（Tumor-associated fibroblasts, TAFs），促进血管组织的扩张和肿瘤发展，也能够分化为外周细胞和肿瘤血管壁细胞，促进肿瘤血管的形成。在病理条件下，包括炎症、组织损伤、肿瘤，间充质干细胞能够从骨髓中被招募和归巢到损伤部位或者是肿瘤部位^[6]。2007年Karnoub等^[31]研究表明，将人的MSCs和转移能力较弱的乳腺癌细胞MDA-MB-231共同接种裸鼠乳腺脂肪垫，MSCs旁分泌的细胞因子CCL5可结合乳腺癌细胞表面受体CCR5，从而显著性地增强乳腺癌细胞的转移能力，使其向肺部发生转移，而其他成纤维细胞则不具有此能力。2011年Liu等^[32]研究表明，MSCs能够发挥调节乳腺癌干细胞（Breast cancer stem cells）自我更新的作用，彼此之间通过旁分泌IL-6和CXCL7这两个细胞因子形成循环反馈作用，从而促进肿瘤的生长。2012年Li等^[29]研究表明，肿瘤细胞分泌IL-1刺激MSCs分泌前列腺素E₂（PGE₂），IL-1和PGE₂协同作用促进MSCs旁分泌更多的细胞因子，进而激活肿瘤细胞下游 β -catenin信号通路，形成肿瘤干细胞微环境，促进肿瘤生长。2013年Jung等^[33]也研究表明，肿瘤细胞通过分泌CXCL16募集MSCs到肿瘤微环境中，并与MSCs其上受体CXCR6相互作用，刺激MSCs以CAFs的形式分泌CXCL12，使肿瘤细胞发生EMT过程，进一步增加肿瘤细胞CXCR4受体表达量，最终促进前列腺癌的转移。

间充质干细胞不仅与肿瘤细胞相互作用，也能与肿瘤微环境中的其他基质细胞相互作用，例如巨噬细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、T细胞、B细胞等，从而影响肿瘤的发生发展和转移。2012年Ren等^[34]研究表明，自发性淋巴瘤来源的MSCs（L-MSCs）能够间接促进肿瘤生长，这是因为L-MSCs能促进CD11b⁺Ly6C⁺单核细胞、F4/80⁺巨噬细胞以及CD11b⁺Ly6G⁺中性粒细胞聚集到肿瘤微环境中，而这个过程是通过L-MSCs分泌大量的配体CCL2，这些基质细胞高表达CCR2受体实现的。Liotta等^[6]研究结果显示，肿瘤微环境中的MSCs（Tumor-MSCs）能够抑制CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞体外增殖，以及分泌TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子，且抑制效果与MSC/T细胞比例呈正相关，从而促进头颈部鳞状细胞癌（HNSCC）的发展。这些都说明在肿瘤发生发展中，间充

质干细胞能够与肿瘤细胞和其他基质细胞相互作用，从而促进肿瘤发生发展。

1.2.2 间充质干细胞与基质蛋白

细胞外基质（Extracellular matrix, ECM）是由细胞分泌的外基质蛋白，它们组成一个复杂的动态网络结构，是器官、组织和细胞的物理性支架。肿瘤微环境中不同类型的细胞能够提供不同的细胞外基质蛋白，共同调节组织微环境，参与损伤修复、维持器官稳态以及维持结缔组织的正常功能十分重要。细胞外基质不仅能限制肿瘤发生发展的早期阶段，也能够对后期疾病的发展起到驱动作用，因此细胞外基质的成分可以作为临床预后的主要预测指标。例如肿瘤细胞外基质中高表达蛋白酶抑制剂（例如丝氨酸蛋白酶抑制剂）预示着良好的预后，而高表达整合素和金属基质蛋白酶（Matrix metalloproteinases, MMPs）则预示着有肿瘤复发的风险^[35]。值得注意的是，具有不同转移能力的原位瘤，它们肿瘤和基质细胞来源的 ECM 成分都不尽相同，这些都表明细胞外基质对于癌症治疗十分关键^[30, 36]。基质蛋白（Matricellular proteins）是一类非结构性的细胞外基质蛋白，包括血小板反应蛋白（Thrombospondin-1, TSP1）、骨桥蛋白（Osteopontin, OPN）、Periostin、TGFB1、SPARC、Tenascin-C（TNC）、CCN 等^[37, 38]。基质蛋白在绝大多数成体组织中表达量都很低，但当组织损伤或者发生炎症反应时表达量增高，它们能够结合其他细胞外基质蛋白，或者是生长因子、细胞因子、细胞表面受体等参与调节组织微环境^[38]。

间充质干细胞在肿瘤中发挥着重要作用，这也与基质蛋白有着密不可分的关系。El-Haibi 等^[39]研究表明，人的 BM-MSCs 和乳腺癌细胞相互接触后，促使肿瘤细胞中 CD44 入核结合 *LOX* (lysyl oxidase) 启动子，驱动 *LOX* 转录，增强 *Twist* 转录表达，因此骨髓间充质干细胞促进乳腺癌细胞高表达 *LOX*，从而促进肿瘤侵袭、转移和 EMT 过程。Mi 等^[40]研究表明，肿瘤细胞来源的基质蛋白 OPN 能够结合 MSCs 其上整合素，使 MSCs 高表达 CCL5、MMPs 以及 CAFs 分子标记，例如 α -SMA（5 倍）、CXCL12（5 倍）、TNC（9 倍）、FSP-1（12 倍）等，显著性地促进肿瘤细胞生长和转移，也促进 MSCs 转移到肺部和肝脏。CCN1（CCN family member 1）属于细胞外基质相关 CCN 蛋白家族，这个蛋白具有调节细胞迁移、粘着、增殖、分化、诱导血管生成和细胞凋亡等功

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.